

# 紫外线和He-Ne激光诱变 产植酸酶黑曲霉菌株的研究

张卫兵, 郭爱莲, 甘伯中\*

(甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃农业大学研究测试中心,  
甘肃省干酪素工程技术研究中心, 甘肃兰州 730070)

**摘要:** 采用He-Ne激光(波长632nm, 功率10mW)和紫外线对植酸酶产生菌黑曲霉Px的孢子和原生质体进行诱变。结果表明: 原生质体对紫外线诱变的耐受能力比孢子强, 而对He-Ne激光诱变的耐受能力比孢子弱。经诱变后筛选出一株突变菌株L2-2, 植酸酶产量为9274 IU/mL, 是出发菌株的1.51倍, 传代实验表明该菌株植酸酶产量稳定。

**关键词:** 植酸酶, He-Ne激光, 原生质体, 孢子

## Mutation breeding of *Aspergillus Niger* with high phytase activity by ultra violet and He-Ne laser irradiation

ZHANG Wei-bing, GUO Ai-lian, GAN Bo-zhong\*

(College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Analysis and Research Center of Gansu Agricultural University, Gansu Casein Engineering Technical Research Center Lanzhou, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** The protoplasts and spores of the origin strain Px were treated by laser and UV radiation to obtain strain with high phytase activity. Mutant L2-2 was obtained, whose phytase activity was 9274 IU/mL, as 1.51 times as the original strain. A good application and exploitation perspective of this strain was shown.

**Key words:** phytase; He-Ne laser; protoplasts; spore

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)10-0228-03

植酸磷是在植物性饲料中以植酸盐形式存在的有机磷化合物<sup>[1]</sup>。植酸磷的利用率因动物种类的不同而不同, 反刍动物瘤胃中的微生物能产生植酸酶, 因而植酸磷的利用率较高; 非反刍动物因消化道缺乏植酸酶, 因而植酸磷的利用率低<sup>[2]</sup>。植酸酶能催化饲料原料中的植酸及其盐类水解成六磷酸肌醇和磷酸等可利用成分, 因此能提高植酸磷的利用率<sup>[3]</sup>。石杨红等报道, 添加植酸酶可提高肉鸡的全净膛率、腿肌率和腹脂率等<sup>[4]</sup>。孟婕等研究了不同的植酸酶添加水平对艾维茵肉仔鸡的生产性能、骨骼发育和健康状况的影响, 结果表明, 植酸酶适宜添加量为500FTU/kg<sup>[5]</sup>。蔡景义等研究结果表明, 菜籽粕和棉籽粕中植酸磷消化率与植酸酶的添加量呈极显著二次曲线关系<sup>[6]</sup>。目前存在的阻碍植酸酶发酵生产和应用的因素主要有菌种的酶产量低、酶学性质不适宜等。要改变这一现状, 关键在于选育优良高效的植酸酶产生菌。在低

功率激光中位于可见光范围内的He-Ne激光是在微生物诱变选育时应用最广泛的激光<sup>[7-9]</sup>。原生质体失去细胞壁的保护作用, 对环境、诱变剂等更为敏感, 因此采用原生质体作为诱变材料, 效果往往较传统方法更为理想<sup>[9-10]</sup>。前期本实验室从自然界筛选出了产植酸酶菌株黑曲霉Px, 并对该菌株产植酸酶的条件进行了研究<sup>[11-12]</sup>。本研究以黑曲霉Px为出发菌株, 分别用He-Ne激光和紫外诱变原生质体和孢子, 以筛选高产菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

黑曲霉 (*Aspergillus niger* Px) 本实验室筛选并保藏; 菌丝生长培养基 蛋白胨0.3%, 葡萄糖1.5%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003%, pH 5.5; 斜面种子培养基 麸皮汁100mL, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003%, 琼脂1.5%~2%, pH5.5; 再生培养基 酵母膏2%, 葡萄糖4%, NaNO<sub>3</sub> 0.3%, KCl 1.05%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01%, pH6.0, 上层含0.8%琼脂, 下层含2%琼脂, 用0.6mol/L NaCl溶液进行配制;

收稿日期: 2010-09-21 \* 通讯联系人

作者简介: 张卫兵(1974-), 男, 副教授, 博士研究生, 研究方向: 应用微生物。

基金项目: 甘肃省农业生物技术专项项目(GNSW-2006-14); 甘肃省科技重大专项项目(0702NKDA034)。

固体筛选培养基 葡萄糖1.5%,植酸钙0.1%,青霉素钠200U/mL, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003%, 琼脂1.5%~2%, pH5.5; 液体产酶培养基 蛋白胨0.3%, 葡萄糖1.5%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003%, pH5.5。

He-Ne激光发生器(波长632nm,功率10mW) 西北大学光电厂; 高速冷冻离心机 日本HitachiR22G; 恒温水浴摇床 HZS-H型, 哈尔滨东联电子有限公司; 高压灭菌锅 CRDX-280型, 上海申安医疗器械厂; 超净工作台 SW-CJ-1F型, 苏州苏净集团; 生物显微镜 XS-18型, 上海上光集团; 三辊式压榨机 TJ-305型, 国营潮州市农机一厂; pH计 型号: PHS-3C, 上海雷磁仪器有限公司; 分析天平 型号: BS224S, 德国塞多利斯公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 孢子悬液的制备 黑曲霉斜面用10mL无菌水洗下,玻璃珠振荡0.5h,将上述孢子液3000r/min离心10min,弃上清液,然后用无菌生理盐水将所得孢子洗涤2~3次,将孢子浓度调整为10<sup>6</sup>个/mL左右待用。

1.2.2 孢子的紫外诱变 将制备黑曲霉孢子悬液调整到适当浓度,吸取9mL移入4个无菌培养皿中,用15W紫外灯照射,距离30cm,照射一定时间后涂布于固体筛选培养基上,30℃恒温培养至长出菌落,接至液体产酶培养基中进行复筛,同时计算存活率和正变率。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{处理后的活菌数}}{\text{处理前的活菌数}} \times 100\%$$

$$\text{正变率}(\%) = \frac{\text{正突变的菌株数}}{\text{诱变后的活菌数}} \times 100\%$$

1.2.3 孢子的激光诱变 将制备的黑曲霉孢子悬液调整到适当浓度,取0.2mL置于直径0.5cm小试管,用He-Ne激光进行照射,输出功率9mW,扩束光斑直径2.5mm,照射距离30cm,照射不同的时间,涂布于固体筛选培养基上,30℃恒温培养至长出菌落,接至液体产酶培养基中进行复筛,同时计算存活率和正变率。

1.2.4 原生质体的制备 将已培养好的菌丝置于离心管中,2000r/min离心15min,弃上清液。再用渗透压稳定剂洗涤二次。称量后,按300mg湿菌丝加1mL酶液,在一定温度下酶解,间或振荡,酶解时每隔0.5h取样在显微镜下观察,当大多数细胞形成原生质体时,停止酶解。将酶解液用灭菌的三层无菌擦镜纸过滤后,4000r/min离心10min,收集原生质体,用渗透压稳定剂洗涤和稳定,用血球计数板计数,得出原生质体的形成数。

1.2.5 原生质体的紫外诱变 将纯化后的原生质体用高渗液稀释至约10<sup>5</sup>个/mL的悬液,用15W紫外灯照射,距离30cm,照射不同的时间后涂布于再生培养基平板上,30℃恒温培养至长出菌落,在固体筛选培养基和液体产酶培养基上进行初筛和复筛,同时计算存活率和正变率。

1.2.6 原生质体的激光诱变<sup>[13]</sup> 将纯化后的原生质体用高渗液稀释至约2.5×10<sup>3</sup>个/mL,取0.2mL置于直径0.5cm小试管,用He-Ne激光进行照射,输出功率

9mW,扩束光斑直径2.5mm,照射距离30cm,照射不同的时间,涂布于再生培养基平板上,30℃恒温培养至长出菌落,在液体产酶培养基中进行复筛,同时计算存活率和正变率。

1.2.7 复筛 将诱变后的菌株培养至孢子成熟后,接种3环于液体产酶培养基,30℃培养3d。四层纱布过滤,去除菌体,然后3000r/min离心10min,上清液为粗酶液,测其酶活,选出高产菌株。

1.2.8 突变株的遗传稳定性 在连续传代培养时,由于诱变株的性状常常不稳定。为了检测菌株性状的稳定性,将诱变选出的植酸酶活力较高的菌株在种子培养基上连续传代5次,检测酶活力。通过分析,判断传代次数对酶活性变化影响是否显著。

## 1.3 酶活测定方法<sup>[14]</sup>

取1mL粗酶液,加入2mL植酸钠溶液(用pH为5.5的乙酸-乙酸钠缓冲液配制,浓度为8.4g/L),并摇匀,37℃保温反应30min,立即加入2mL颜色终止显色液,终止并显色,对照组先加入终止显色液灭活后,再加入底物溶液,在415nm处测OD值,参照标准曲线计算酶活。

植酸酶酶活定义:按上述方法,在pH5.5的条件下,每分钟从8.4g/mL的植酸钠溶液中释放1nmol无机磷所需的酶量定义为一个活力单位(IU)。

## 1.4 数据处理

用统计分析软件SPSS16.0对实验数据进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 紫外线对孢子的诱变

紫外线对黑曲霉孢子的诱变结果见表1。

表1 不同紫外处理时间对孢子的影响

诱变时间(s)	60	180	300	420	540
存活率(%)	36	21	15	11	10
正变率(%)	3	8	14	16	13

由表1可以看出,随着照射时间的延长,孢子的存活率逐渐下降,正变率则先增加再减少,在照射420s时正变率达到最高。综合考虑两方面因素,照射时间选择420s较好。

### 2.2 紫外线对原生质体的诱变

紫外线对黑曲霉原生质体的诱变结果见表2。

表2 不同紫外处理时间对原生质体的影响

诱变时间(s)	10	30	60	90	120
存活率(%)	70.3	65.2	50.9	33.9	21.2
正变率(%)	10.3	11.5	21.5	12.3	8.6

由表2可以看出,随着照射时间的延长,孢子的存活率逐渐下降,正变率则先增加再减少,在照射60s时,正变率最高。比较表1和表2的结果,当用UV照射60s时,孢子的存活率为46%,而原生质体却有50.9%,可见原生质体对紫外线的耐受能力比孢子强。原因可能是由于原生质体处在高渗溶液中接受照射,高渗溶液对它起了保护作用。另外在显微镜观察中发现,原生质体易聚集成团,堆积成串和堆,可导致UV照射不均,这可能是原生质体对UV耐受能力强的原因之一,至于其它可能原因,如UV对其表面结构状态的作用机制等有待进一步研究。

### 2.3 激光对孢子的诱变

采用激光对黑曲霉孢子照射不同时间,处理结果见表3。

表3 不同激光处理时间对孢子的影响

诱变时间(min)	5	10	15	20	25
存活率(%)	60.5	42.9	31.7	18.3	11.3
正变率(%)	9.6	17.5	20.1	18.3	16.5

由表3可以看出,随着照射时间的增加,孢子的死亡率逐渐增加,正变率也随着增大,但增加到一定程度,正变率出现下降趋势,可见并非致死率越高,其正变率越高,综合考虑以15min照射剂量为最佳。

### 2.4 激光对原生质体的诱变

采用激光对黑曲霉原生质体照射不同时间,处理结果见表4。

表4 不同激光处理时间对原生质体的影响

时间(min)	2	5	8	11	13
存活率(%)	40.2	21.3	11.5	5.6	3.2
正变率(%)	12	15	25	21	20

由表4可以看出,随着照射时间的增加,黑曲霉原生质体的死亡率逐渐增加,正变率也随着增大,但增加到一定程度,正变率出现下降趋势,可见并非致死率越高,其正变率越高。另外对比表3、表4可以看出,在相同剂量下,原生质体的存活率远远小于孢子照射后的存活率,可见脱去细胞壁的原生质体比孢子对激光的反应更为敏感。正变率以照射8min时为最高,所以照射时间以8min为最佳,此时具有较高的致死率和较高的正变率。

### 2.5 突变株筛选结果

经紫外线和激光对原生质体和孢子分别进行多次诱变,从得到的突变株中筛选酶活较高的菌株,其中酶活较大的几株见表5、表6。

表5 紫外诱变突变株的酶活

突变株编号	UV1-1	UV1-2	UV1-3	UV1-4	UV2-1	UV2-2	UV2-3	UV2-4
酶活(IU/mL)	8251	8193	8657	7321	7452	7814	7363	7361

表6 激光诱变突变株的酶活

突变株编号	L1-1	L1-2	L1-3	L1-4	L2-1	L2-2	L2-3	L2-4
酶活(IU/mL)	8011	8143	7687	7032	8266	9274	8362	8568

从表5可以看出,紫外诱变所选出的突变株中UV1-2、UV1-3植酸酶产量较高,两株菌都是紫外线诱变孢子后筛选出的;激光诱变所选出的突变株中L2-2植酸酶产量最高,可达9274 IU/mL,为出发菌株的1.51倍,该菌株由原生质体经激光诱变后获得。

### 2.6 突变株L2-2的遗传稳定性

将所得L2-2菌株连续传代5代,液体摇瓶发酵后测定植酸酶产量,实验结果见表7,方差分析结果见表8。

由表7可以看出,不同代菌株植酸酶产量在9270~9275 IU/mL之间,可见该菌株的酶活变化不大。另外通过方差分析(表8)可知,其组间差异的P值远

远大于0.05,说明传代次数对酶活性变化影响不显著,表明突变株L2-2具有稳定的遗传性。

表7 不同代次的酶活

代数	1	2	3	4	5
1	9273	9270	9275	9273	9274
2	9270	9275	9274	9274	9275
3	9274	9273	9274	9275	9272

表8 传代实验的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
组间	0.529	4	0.132	0.166	0.951
组内	7.967	10	0.797		
合计	8.496	14			

## 3 结论

3.1 采用He-Ne激光和紫外线对植酸酶产生菌Px的孢子和原生质体进行多次诱变,选育出一株高产突变株L2-2,植酸酶产量为9274 IU/mL,是出发菌株的1.51倍。

3.2 原生质体对紫外线诱变的耐受能力比孢子强,而对He-Ne激光诱变的耐受能力比孢子弱。

3.3 对突变株L2-2进行传代稳定性实验,结果表明,经传代后,突变株植酸酶产量稳定,遗传性稳定性好。

## 参考文献

- [1] 张铁鹰,罗士津.植酸酶在生长猪中的研究及应用进展[J].饲料与畜牧,2010(4):47-52.
- [2] 于炎湖.植酸的抗营养作用及植酸酶在饲料中的应用[J].粮食与饲料工业,1999(2):25-27.
- [3] Nagashima T, Tange T. Dephosphorylation of phytate by using the *Aspergillus niger* phytase with a high affinity for phytate[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(10):4682-4684.
- [4] 石杨红,郭艳丽,李发弟,等.葡萄糖酸钠和植酸酶对肉鸡营养利用和屠宰性能的影响[J].甘肃农业大学学报,2009,44(1):44-48.
- [5] 孟婕,郝正里,魏时来,等.不同植酸酶添加水平对肉仔鸡生产性能的影响[J].甘肃农业大学学报,2007,42(2):1-7.
- [6] 蔡景义,付雪梅,王之盛,等.生长猪添加植酸酶对植物性蛋白饲料磷消化率的影响研究[J].中国饲料,2009(6):26-28.
- [7] 王卫卫,任鹏康,闫明,等. He-Ne激光对 $\gamma$ -亚麻酸产生菌少根根霉的诱变作用[J].光子学报,2002,31(2):157-161.
- [8] 向洋.激光生物学[M].长沙:湖南科技出版社,1995:73-226.
- [9] 朱宏莉,郭爱莲,宋纪蓉,等.氩-氟激光诱变细菌细胞及原生质体选育果胶酶高产菌株[J].光子学报,2005,34(11):1693-1696.
- [10] 杜海英,于宏伟,韩军,等.原生质体诱变选育乳糖酶高产菌株[J].微生物学通报,2006,33(6):48-51.
- [11] 张卫兵,郭爱莲.植酸酶高产菌Px培养基的筛选和优化[J].中国饲料,2005(9):20-22.
- [12] 张卫兵,甘伯中,李帆,等.一株产植酸酶菌株的分离及酶学性质的初步研究[J].中国饲料,2009(9):26-28.
- [13] 李平,宛晓春.复合诱变黑曲霉选育 $\beta$ -葡萄糖苷酶高产菌株[J].菌物系统,2000,19(1):117-121.
- [14] 张若寒.植酸酶活性的检测方法[J].中国饲料,1997(5):30-32.